



TITLE:

Amyotrophic lateral sclerosis models derived from human embryonic stem cells with different superoxide dismutase 1 mutations exhibit differential drug responses(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Isobe, Takehisa

CITATION:

Isobe, Takehisa. Amyotrophic lateral sclerosis models derived from human embryonic stem cells with different superoxide dismutase 1 mutations exhibit differential drug responses. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19579>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	磯 部 武 久
論文題目	Amyotrophic lateral sclerosis models derived from human embryonic stem cells with different superoxide dismutase 1 mutations exhibit differential drug responses (ヒト胚性幹細胞由来筋萎縮性側索硬化症モデル細胞はSOD1 変異の違いにより異なる薬剤反応性を示す)		
(論文内容の要旨)			
<p>筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、上位および下位運動神経細胞の神経変性や細胞死を特徴とする神経変性疾患である。ALS の 10%は遺伝子変異を伴う家族性 ALS で、その内の 20%は SOD1 遺伝子の変異が原因である。これまでに報告されている 100 以上の SOD1 変異の内、特に G85R や G93A 変異トランスジェニックマウス（マウスモデル）が ALS の病態を忠実に再現する事から、疾患メカニズム解析や創薬研究などに広く用いられてきた。しかし、マウスモデルとヒトでの治験では薬剤効果が異なる事が多く、マウスとヒトの種差、疾患原因遺伝子や遺伝子変異の違い、また遺伝的背景の相違が薬剤反応に影響を与えていると考えられているが、詳細に検討された例はほとんどない。そこで本研究では、特に遺伝的背景を同一にすることで厳密な SOD1 変異間の比較検討を行う事を目的に、ヒト胚性幹細胞（ヒト ES 細胞）由来 ALS モデル細胞を用いて、SOD1 変異の違いが薬剤反応性に与える影響について調べた。</p> <p>はじめに、ヒト ES 細胞の HPRT 遺伝子座へ変異 SOD1 発現ベクター（野生型、A4V 変異、G85R 変異、G93A 変異）を遺伝子導入する事で、変異 SOD1 過剰発現 ES 細胞（変異 ES 細胞）株を作製した。各変異 ES 細胞株間には外来性 SOD1 のタンパク質発現量と酵素活性の差は見られず、また遺伝子発現解析から、未分化性マーカー遺伝子の発現が維持されている事が確認された。各株間の増殖速度に差はなく、正常な核型を有していた事から、SOD1 変異（A4V 変異、G85R 変異、G93A 変異）は未分化性維持および染色体安定性に影響を与えない事が明らかとなった。</p> <p>次に、各 ES 細胞株を運動神経細胞へと分化誘導し、親株と変異株の分化効率を比較した。運動神経前駆細胞（OLIG2 陽性細胞）への分化効率に各株間で有意な差は見られず、運動神経細胞（ISL1 または HB9 陽性細胞）への分化効率にも有意な差は見られなかった事から、SOD1 遺伝子の A4V 変異、G85R 変異、G93A 変異は神経分化誘導にも影響を与えない事が示された。</p> <p>次に、ALS モデル動物やモデル細胞の表現型として、運動神経細胞の形態変化が報告されている事から、各 SOD1 変異 ES 細胞株の運動神経細胞への分化誘導後の形態変化に着目した。1 細胞あたりの神経突起の数と細胞体の大きさに各 SOD1 変異の影響は見られなかったが、親株と比べ A4V 変異株と G93A 変異株で神経突起の最大伸長が短くなっており、SOD1 変異が神経突起の伸長に影響を与える事を見出した。この結果をもとに、ALS 治療薬（riluzole、MCI-186）や治療薬候補化合物（kenpaullone、TRO19622）を含む 6 種類の化合物を用いて各 SOD1 変異株の薬剤反応性の評価を行った。A4V 変異株では dbcAMP、Y27632、kenpaullone、TRO19622、G93A 変異株では riluzole、dbcAMP、Y27632、MCI-186 で神経突起の伸長が見られたのに対し、G85R 変異株では kenpaullone、TRO19622 でのみ効果が見られた。これらの結果から、SOD1 変異の違いによって効果が見られる化合物に違いがある事が示された。</p>			

更に、ALS 治療薬として用いられている riluzole と MCI-186 について薬剤濃度の影響を検討したところ、SOD1 変異（A4V 変異、G93A 変異）は薬剤効果を得る至適濃度にも影響を与える事を見出した。
以上の結果から、変異 SOD1 過剰発現 ES 細胞由来 ALS モデル細胞を用いる事で、各 SOD1 変異の違いが ALS 治療薬や治療薬候補化合物の薬剤応答に大きな影響を与える事を明らかにした。本研究結果により、難病である ALS の原因遺伝子の様々な変異と表現型の理解に基づいた創薬研究が大きく進展すると期待できる。
(論文審査の結果の要旨)
筋萎縮性側索硬化症（ALS）は治療法が未だ確立されていない難病として知られている。ALS 原因遺伝子の違いや遺伝子変異の違いが薬剤応答に影響を及ぼすことが ALS 治療薬開発成功の妨げとなっているが、遺伝的背景を統一した上で、ALS 原因遺伝子の異なる変異の薬剤反応性を比較した例はこれまでなかった。
本研究において申請者は、同一遺伝背景を持つ変異 SOD1 過剰発現ヒト ES 細胞を作製し、変異 SOD1 過剰発現細胞株間の細胞特性の比較を行った。その結果、変異 SOD1 過剰発現は ES 細胞の未分化性維持や神経細胞への分化誘導効率に影響を与えないことを示し、また、運動神経細胞分化後の SOD1-A4V 変異過剰発現株および SOD1-G93A 変異過剰発現株で、運動神経細胞の神経突起伸長が阻害されるという ALS の病態を再現した。さらに ALS 治療薬や ALS 治療候補化合物を用いて、運動神経細胞分化後の変異 SOD1 過剰発現細胞株への薬剤効果を変異株間で比較した結果、過剰発現変異 SOD1 の変異の違いが、細胞の薬剤反応性や薬剤効果を得る至適濃度に影響を与えることを初めて示した。
以上の研究は、ヒト多能性幹細胞由来の疾患モデル細胞を用いた薬剤応答性評価の有用性を示しただけでなく、SOD1 変異に着目し比較することで ALS 治療薬開発の進展に貢献し、今後のヒト多能性幹細胞を用いた創薬研究や ALS の創薬研究に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降